Aus der Pathophysiologischen Abteilung (Prof. Dr. med. C. Riebeling)
der Psychiatrischen und Nervenklinik der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Bürger-Prinz)

Experimentelle Untersuchungen zum qualitativen Nachweis der Ausscheidungsprodukte zweier „Tranquillizer" im Harn des Menschen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Hartmut Maintz
aus Bialla/Ostpr.

Hamburg 1961

Aus der Pathophysiologischen Abteilung (Prof. Dr. med. C. Riebeling)
der Psychiatrischen und Nervenklinik der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Bürger-Prinz)

Experimentelle Untersuchungen zum qualitativen Nachweis der Ausscheidungsprodukte zweier „Tranquillizer" im Harn des Menschen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Hartmut Maintz
aus Bialla/Ostpr.

Hamburg 1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg
am: 18.5.1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät Hamburg

Dekan: Professor Dr. R. Prévôt
Referent: Prof. Dr. Riebeling
Korreferent: Prof. Dr. Bürger-Prinz.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methoden zum Nachweis von Meprobamat im Harn	2-3
3. Eigene Untersuchungen zum Nachweis des Versuchspräparates H 87 im Harn	3
a) Die Chemie von H 87 im Vergleich zu Meprobamat	3
b) Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen	4-5
Stellungnahme zu den Ergebnissen	5-6
c) Versuche zum photometrischen Nachweis von H 87 im Harn	6
4. Versuche zum Nachweis von "Marsilid" im Harn	6-14
a) Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen	14-15
b) Schlußfolgerung	15-16
Literaturangaben	17
Lebenslauf	20

1. Einleitung

Im Rahmen der an dem serologischen Labor der Psychiatrischen und Nervenklinik der Universität Hamburg durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis der Ausscheidungsprodukte verschiedener Medikamente im Harn des Menschen interessierte uns besonders der Nachweis zweier Medikamente, die in die Reihe der sogenannten "Tranquillizer" einzuordnen sind.

Da diese Medikamente, die in der medikamentösen Therapie der depressiven Zustände in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen haben, auch außerhalb der Klinik eingenommen werden, erscheint es wichtig, bei der Aufnahme eines Patienten in eine psychiatrische Klinik festzustellen, ob er unter der Einwirkung solcher Medikamente steht.

2. Methoden zum Nachweis von Meprobamat im Harn

1958 gab C.Riebeling (1) eine Methode zum papierchromatografischen Nachweis von Meprobamat im Harn an, nach der er das Medikament als Glukuronsäurelakton im Harn isolieren konnte.

Die Methodik wird im einzelnen folgendermaßen beschrieben:

a) ohne Hydrolyse:

" 10 ml. Urin werden mit 2 x 10 ml. Äther ausgeschüttelt und der Rückstand mit 0,5 ml. Alkohol aufgenommen.

0,05 ml. Alkohol werden auf den Startpunkt eines Streifens Papier (Schleicher u. Schüll 2043 a) gegeben und zum Wandern 16 Stunden in ein Gemisch von 80 ml. Butanol, 20 ml. Eisessig, 20 ml. n/10 HCL und 20 ml. Wasser gehängt.

Nach 16 Stunden wird getrocknet und durch Baden der Streifen in einem Gemisch von 1%-iger alkoholischer Naphtoresorcinlösung und 20%-iger Essigsäurelösung werden die Streifen entwickelt. Dann

gibt man die Streifen zurück in den Trockenschrank.

b) mit Hydrolyse:

Der Urin wird mit einigen Messerspitzen Tierkohle entfärbt, kurz aufgekocht und filtriert, wobei es nicht unbedingt notwendig ist, daß das Filtrat absolut farblos ist. Zu 10 ml. Urin werden 0,4 ml. konz. Schwefelsäure gegeben und 2 Stunden in einem Rückflußkühler gekocht.

Nach dem Abkühlen wird das Hydrolysat weiterbehandelt wie oben."

Als Ergebnisse zeigten sich bei den Chromatogrammen der Patienten, die Meprobamat eingenommen hatten, deutliche gelbe Flecken mit einem Rf-Wert von 0,26 bis 0,3. Auch die Chromatogramme der Patienten, die nicht unter Meprobamat standen, zeigten gelbe Flecken, die aber eine so viel geringere Intensität aufwiesen, daß eine Unterscheidung keinerlei Schwierigkeiten bereitete.

Bernard W. Agranoff, Roy M. Bradley u. Julius Axelrod (2) versuchten, Meprobamat auf photometrischem Wege im Urin nachzuweisen. Das Absorptionsspektrum des Meprobamat enthaltenden Urins zeigte bei der Wellenlänge 300 m.mü eine optische Dichte von 3,5 u. bei der Wellenlänge 500 m.mü eine optische Dichte von 5,0.

Im einzelnen wird folgende Methode angegeben:

3 ml. filtrierter Harn werden im Schüttelzylinder mit 0,2 ml. 0,1 n NaOH u. 5 ml. Äther 5 min. geschüttelt. Die Ätherschicht wird abpipettiert und im Luftstrom bei 40 Grad destilliert. Der Rückstand wird mit 0,1 ml. konz. Schwefelsäure versetzt u. 30 min. in einem lose verschlossenen Reagenzglas erhitzt. Nach Abkühlung werden 2 ml. Wasser hinzugefügt u. nach 5 min. die photometrische Messung mit einer 1 cm Küwette durchgeführt. Dazu wird ein Filter mit der Wellenlänge 450 - 500 m.mü benutzt.

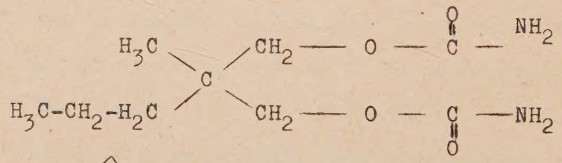
Als Meßwert dient die Differenz der Extinctionen an den beiden Wellenlängen. Man entnimmt die Konzentration einer vorher aufgestellten Eichkurve. Ein Blindwert für meprobamatfreien Harn, der meistens auch eine schwache Farbreaktion zeigt, wird vorher festgestellt u. bei der Berechnung in Abzug gebracht.

3. Eigene Untersuchungen zum Nachweis des Versuchspräparates "H 87" im Harn. (H 87 ist ein Erzeugnis der Kali-Chemie Hannover)

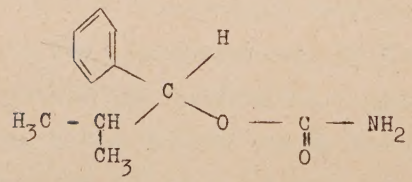
a) Die Chemie von H 87 im Vergleich zu Meprobamat: (3)

Meprobamat ist ein Ester aus einem zweiwertigen primären Alkohol u. Carbaminsäure, der am quartären C-Atom 2 Alkylgruppen enthält.

Bei dem Präparat "H 87" handelt es sich um einen Carbaminsäureester des 1-Phenyl-2-methyl-propanols eines einwertigen sekundären Alkohols, bei dem sich am tertiären C-Atom eine Isopropylgruppe und ein aromatischer Ring befinden.



Meprobamat



H 87

Zum Nachweis von H 87 im Harn verfuhren wir zunächst genau nach der von C. Riebeling angegebenen Methode. Da jedoch nach dieser Methode noch keine deutlichen Ergebnisse für den Nachweis von H 87 im Harn auftraten, ergaben sich im Laufe der

Untersuchungen einige Abwandlungen der Versuchsanordnungen. Im einzelnen bauten wir folgende Änderungen ein:

1. Statt mit Äther wird das Hydrolysat mit Chloroform ausgeschüttelt.
2. Ausschütteln des Hydrolysates mit den Lösungsmitteln Collidin u. Lutidin.
3. Entfärben des Hydrolysates mit Kohle.
4. a) Hydrolysit wird direkt auf den Chromatografiestreifen aufgetragen.
   b) Neutralisieren des Hydrolysates mit n/10 NaOH.
   c) Auswaschen der Filter, die für die Entfärbung des Urins benutzt wurden, mit n/10 HCL, auftragen des Filterauszuges direkt auf den Papierstreifen, oder nach Ausschütteln mit einem der vier genannten Lösungsmittel (Äther, Chloroform, Lutidin, Collidin).
5. Hydrolysieren des Urins mit konz. HCL statt mit Schwefelsäure.
6. Veränderungen der Steiglösungen:
   a) Butanol-Essigsäure
   b) Collidin mit wenig Ammoniak
   c) Phenol mit wenig Ammoniak

b) Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen:

Nach den erwähnten Methoden wurden 43 Urine von solchen Patienten untersucht, die H 87 eingenommen hatten. Als Blindversuche wurden dagegen 13 Urine von Patienten untersucht, die nicht unter H 87 standen.

Insgesamt wurden von den H 87 enthaltenden Urinen u. den Leerurinen 70 Chromatogramme mit je 3 Startpunkten angefertigt, so daß etwa 210 Einzelergebnisse zur Verfügung standen.

Die Dosierung bestand meistens in einer einmaligen Gabe von 3-4 Tabletten zu je 400 mg.

Danach wurde der Urin in Zeitabständen von 3-36 Stunden chromatografiert.

Bei den Chromatogrammen, die im Gemisch Butanol-Essigsäure als Steiglösung gelaufen waren, und bei denen Äther oder Chloroform zum Ausschütteln der Urine bzw. der Hydrolysate benutzt wurde, zeigten sich in der überwiegenden Zahl der Fälle blassrote bis dunkelrote Flecken, deren Rf-Wert als Durchschnitt 0.29 ergab.

Der Unterschied zwischen dem hydrolysierten und dem nicht hydrolysierten Material bestand in der Intensität der Flecke zugunsten der hydrolysierten Urine.

Allerdings wiesen die Chromatogramme von den nicht mit H 87 behandelten Patienten ebenfalls rote Flecken auf, deren Intensität geringer u. deren Rf-Wert in einzelnen Fällen niedriger lag.

Bei den Chromatogrammen, bei denen Collidin oder Phenol als Steiglösung benutzt wurde, tendierte die Farbe der aufgetretenden Flecken mehr zum Blau, jedoch war der Unterschied zu den Blindversuchen nicht deutlich genug.

Stellungnahme zu den Ergebnissen:

Bei den Untersuchungen zum Nachweis des Ausscheidungsproduktes von Meprobamat im Harn war durch die Hydrolyse das Glukuronsäurelakton freigemacht worden, das papierchromatografisch nachgewiesen wurde.

Da nun der Urin zur H 87-Bestimmung im Harn auch hydrolysiert wurde, hofften wir auch diese Substanz wegen ihrer verwandten chemischen Struktur als Glukuronsäurepaarling nachweisen zu

zu können.

Da sich aber keine eindeutigen Unterschiede zu den Blindversuchen ergaben, muß angenommen werden, daß das Präparat H 87 in einer anderen, mit unseren Methoden nicht zu erfassenden Form ausgeschieden wird.

c) Versuche zum photometrischen Nachweis von H 87 im Harn

Als nächstes versuchten wir, H 87 auf photometrischem Wege im Urin nachzuweisen, wobei wir nach der oben erwähnten Methode von Agranoff, Bradley u. Axelrod (2) verfuhren. Auch hier erzielten wir trotz zahlreicher Versuche keine brauchbaren Ergebnisse.

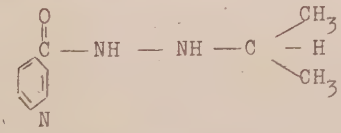
4. Versuche zum Nachweis von "Marsilid" im Harn

Als zweites Präparat untersuchten wir "Marsilid", ein von der deutschen Hoffmann-la Roche herausgegebenes Medikament.

Marsilid ist ein 1-Isonicotinyl-2-isopropylhydracin.

Die freie Base kristallisiert in Form farbloser Nadeln vom Schmelzpunkt 112 Grad, die in Wasser leicht löslich sind.

Der pH-Wert der 2,5 %-igen Lösung beträgt ca. 7,0. Die Tabletten enthalten den Wirkstoff in Form eines Phosphates. (4)



Marsilid

Diese Substanz ist auch unter den Namen "Iproniacid" u. "Isoniacid" bekannt.

Morris u. B. Jacobs (5) erarbeiteten eine Methode zur Mikrobestimmung des Isoniacids, allerdings in reiner Lösung.

Im einzelnen wird folgende Methode angegeben:

"Das Prinzip besteht darin, daß der Hydracinanteil des Marsilids Kaliumferricyanid reduziert und so einen Farbumschlag her-

vorruft, der photometrisch gemessen werden kann.

Methode:

1. Reagenzien:

a) 1 g. Kaliumferricyanid sind in 250 ml. destilliertem Wasser aufzulösen. Die Lösung wird in einer braunen Flasche im Kühlschrank aufbewahrt. Für den täglichen Gebrauch sind kleine braune Flaschen zu füllen.

b) 2 n - Essigsäure.

2. Standardlösungen:

200 mg. des Isoniacids sind sorgfältig abzuwiegen und in 200 ml. destilliertem Wasser aufzulösen.

Dieses ist die Standardlösung, sie enthält 1 mg./ml.

1 ml. der Standardlösung werden auf 50 ml. mit destilliertem Wasser verdünnt. Diese Lösung enthält 20 mü.g./ml.

Um eine Standardkurve herzustellen, werden bekannte Volumina der verdünnten Standardlösung, die die gegebenen Mengen von Isoniacid enthalten, auf 4 ml. dest. Wasser verdünnt, und es wird wie beschrieben fortgefahren. Es empfiehlt sich, einen niedrigen und einen hohen Standard für jede Reihe der unbekannten Bestimmungen zu nehmen, statt eine feste Standardkurve zu benutzen.

1 ml. einer derartig präparierten Lösung werden in einem Reagenzglas mit 3 ml. dest. Wasser versetzt. Dazu kommen 0,5 ml. 2 n - Essigsäure. Schütteln! 0,5 ml. Kaliumferricyanid werden hinzugefügt.

Das Reagenzglas wird 5 min. in ein kochendes Wasserbad gestellt.

Danach wird 1 min. unter fließendem Wasser abgekühlt.

Genau 15 min. nach Beginn des Wasserbades wird in einem "Klett-

Summerson" photoelektrischen Photometer abgelesen unter Verwendung eines Filters No. 66.

Die Ergebnisse sind mit gleichbehandelten Standardlösungen zu vergleichen, oder es ist eine präparierte Kurve zu benutzen."

Da nach den Angaben des Herstellerwerkes von Marsilid in den ersten 24 Stunden 12 % der verabreichten Dosis als Iproniacid im Harn ausgeschieden werden, versuchten wir, den reduzierenden Anteil des Medikamentes, nämlich den Hydracinanteil zu prüfen. Wir verfuhren nach der oben erwähnten Methode und bestimmten zunächst reine bekannte Marsilidlösungen. Als Leerwert gegenüber den Marsilid enthaltenden Lösungen bestimmten wir gleichbehandelte Lösungen ohne Marsilid und lasen jeweils den Unterschied der Extinction bzw. der Absorption in % ab. Wir benutzten ein Filter mit der Wellenlänge 578 m.mü.

Die nachfolgende Tabelle zeigt einige Versuchsergebnisse mit reiner Marsilidlösung in verschiedenen Konzentrationen.

mg.Mars. pro ml.	% der Absorption	Extinction	Filter	Küwette
1,0	17	0,8	578	1 cm
0,5	24	0,63	578	1 cm
0,25	25	0,6	578	1 cm
0,125	32	0,49	578	1 cm
0,063	41	0,37	578	1 cm
20 müg.	59	0,235	578	1 cm

Die Versuche zur photometrischen Bestimmung von Marsilid im Urin brachten keine brauchbaren Ergebnisse, so daß auch die photometrische Methode als Nachweis für die Ausscheidungsprodukte des Marsilids im Urin ausscheiden muß.

Wir prüften auch eine von der wissenschaftlichen Abteilung des Herstellerwerkes angegebene Versuchsanordnung, nach der Marsilid im Urin papierchromatografisch zu bestimmen ist. Im einzelnen wird folgende Methodik angegeben: (6)

" Je 40 ml. des zu untersuchenden Urins sowie mindestens zweier weiterer Urinproben von nicht mit Marsilid oder anderen Medikamenten behandelten gesunden Personen werden in eine mit einem eingeschliffenen Glasstopfen verschließbare Flasche von ca. 200 ml. Inhalt pipettiert.

2. Zugabe von 100 ml. Chloroform purissimum (Merck).

3. Zusatz von 15 g. einer homogenen Mischung von 30 Gewichtsteilen fein gepulvertem Natriumthiosulfat sicc. pro anal. und 1 Gewichtsteil fein gepulvertem MgO purum, unter sofortigem kräftigen Schütteln zur Vermeidung des Zusammenbackens des Sulfates.

4. Schütteln der gut verschlossenen Flasche während 30 min. auf einem Schüttelapparat.

5. Zentrifugieren bis zur genügenden Phasentrennung.

6. Entnahme der organischen Phase und Eindampfen eines Teils derselben auf 1/5 oder 1/10 ihres anfänglichen Volumens.

7. Auftragen von je 0,5 ml. der eingedampften Extrakte sowie einer Lösung von 50 gamma/ml. Iproniacidphosphat in Methanol (als Vergleichslösung) auf dem gleichen Streifen von Whatman Nr. 1-Papier.

8. Absteigend chromatografieren unter Benützung des folgenden Laufmittelsystems:

Aethylacetat: Konz. Ameisensäure puriss. p.A. : H_2O = 65:5:30 (nach vorheriger Absättigung der Papiere über Nacht im Dampf der wässerigen Phase.

9. Die trockenen Papiere werden besprüht mit alkalischer Silbernitratlösung nach Cramer, bestehend aus 1 Volumteil 0,1 n Silbernitratlösung und 1 Volumteil 5 n Ammoniaklösung und 1 Volumteil 2 n NaOH-Lösung.

10. Wenn die Flecken nicht gleich auftreten, Hin- u. Herbewegen der Papiere über einem kochenden Wasserbad.

11. Baden der Streifen in einer 5 %-igen wässerigen Lösung von Natriumthiosulfat.

12. Baden der Papiere in reinem Aqua dest. u. trocknen.

Wenn im Chromatogramm der zu untersuchenden Probe auf der Höhe des Fleckens der Marsilidvergleichslösung ein grauer bis schwarzer Fleck auftritt, der in den Chromatogrammen der O-Proben fehlt, so ist damit die Anwesenheit von Marsilid im fraglichen Urin mit hoher Sicherheit nachgewiesen."

Nach dieser Methode stellten wir insgesamt 106 Chromatogramme her. Und zwar 16 Chromatogramme mit der Standardlösung (50 gamma/ml. Iproniacid), 27 Chromatogramme von Patienten, die kein Marsilid eingenommen hatten und 58 Chromatogramme von Patienten, die mit Marsilid behandelt wurden.

Es standen 4 Patienten zur Verfügung, von denen der Urin laufend auf Marsilid untersucht wurde.

Die oben angegebene Methode wurde insofern etwas variiert, als wir aufsteigend statt absteigend chromatografierten. Die besten Resultate zeigten die Chromatogramme der Standardlösungen (50 gamma/ml. Iproniacid).

Es zeigten sich hier in allen Fällen deutliche, scharf begrenzte braune bis dunkelbraune Flecken mit einem Durchschnitts-Rf-Wert von 0,33.

Bei den Chromatogrammen der mit Marsilid vorbehandelten Patienten wurde die Startpunktkonzentration, die in der Versuchsreihe mit 0,5 ml. angegeben wurde, von 0,5 ml. bis 0,7 ml. variiert. Bei diesen Chromatogrammen traten nur in sehr wenigen Fällen schwache braune Flecken auf, die einen Durchschnitts-Rf-Wert von 0,32 zeigten. Bei der Mehrzahl der Chromatogramme traten überhaupt keine Flecken auf, so daß der Marsilidnachweis nach dieser Methode nach unserer Meinung eine nicht ausreichende Sicherheit bietet.

Da Marsilid ein Nikotinsäureabkömmling ist, beschritten wir in der folgenden Versuchsreihe den Weg über die Nikotinsäure bzw. die Nikotinsäureamidbestimmung.
Dazu einige Bemerkungen über die allgemeine Bedeutung der Nikotinsäure u. des Nikotinsäureamids: (7)

1. Nikotinsäureamid ist als PP-Faktor (Pellagra-preventive-factor) in der Reihe des Vitamin B_2-Komplexes bekannt und wurde von Elvehjem u. Mitarbeitern in seiner chemischen Struktur aufgeklärt. Eine gleichartige Wirkung hat die Nikotinsäure, die aber im allgemeinen in der Nahrung nicht vorkommt.
2. Außerdem ist die Nikotinsäure beim Menschen ein Abbauprodukt der Aminosäure Tryptophan und entsteht über den Weg der Chinolinsäure (8).
3. Nikotinsäure und Niktonsäureamid werden normalerweise im Organismus umgewandelt und als folgende Produkte ausgeschieden:
   a) N_1-Methyl-nicotinsäureamid
   b) N_1-Methyl-2-pyridon-5-carboxylamid
   c) N_1-Methylnicotinsäure
   d) Nicotinursäure (9)

"Kodiceck" u. "Hübner" (10) geben für die Trennung von Isonikotinsäure, Nikotinsäure u. Nikotinsäureamid folgende papierchromatografische Methode an:

"Laufmittelsystem: Butanol-Ameisensäure (12+1), wassergesättigt. Anfärbung mit Jodplatinreagenz: Hierbei handelt es sich um eine Lösung, die aus gleichen Raumteilen einer 0,135 %-igen wässerigen Platinchlorwasserstofflösung und einer 1,1 %-igen wässerigen Kaliumjodidlösung besteht, die unmittelbar vor dem Gebrauch gemischt wird."

Auch diese Methode versuchten wir, zur Marsilidbestimmung im Harn anzuwenden. Die Ergebnisse befriedigten aber nicht.

Donald Buyske, John M. Flowers jr., Pelham Wilder jr. u. Marcus E. Hobbs (11) konnten papierchromatografisch aus dem Rauch von Zigarettentabak 6 einzelne auf die Ninhydrinreaktion positiv reagierende Fraktionen isolieren und hieraus wiederum Glutaminsäure u. Glutamin identifizieren.

Die Wanderung der Pyridinalkaloide Nikotinsäure und Nikotinsäureamid auf gepuffertem Papier wird als eine Funktion des pH-Wertes des Puffers charakterisiert.

Die Autoren tränkten das Papier mit einer Natriumacetatpufferlösung von pH 6,3 und trugen auf die getrockneten Streifen die Substanzlösungen auf.

Als Lösungsmittel verwendeten sie n-Butanol-Essigsäure-Wasser im Verhältnis von 40:10:50.

Als Rf-Werte der Nikotinsäure und des Nikotinsäureamids fanden sie 0,3 bzw. 0,8. Die Werte wurden nach einer Farbreaktion mit p-Aminobenzoesäure in einer Cyanbromidatmosphäre bestimmt.

Diese von den amerikanischen Autoren angegebene Methode erwies sich in unseren folgenden Versuchen in Kombination mit der vom Herstellerwerk angegebenen Methode am brauchbarsten für die papierchromatografische Bestimmung von Iproniacid im Harn.

Der Analysengang verläuft im einzelnen folgendermaßen:

1. 40 ml. des zu untersuchenden Urins werden mit 100 ml. Chloroform versetzt und in einen Schütteltrichter gegeben.
2. Zugabe von 15 g. einer homogenen Mischung aus 30 Gewichtsteilen Natriumthiosulfat und einem Gewichtsteil MgO. Sofort schütteln!
3. 30 min. schütteln auf einem Schüttelapparat.
4. Zentrifugieren bis zur genügenden Phasentrennung.
5. Eindampfen der Chloroformphase bis auf ca. 3 ml.
6. Pufferung der Papierstreifen:

   a) Herstellung der Pufferlösung: 21 g. Citronensäure werden mit 300 ml. n-NaOH versetzt und auf 1 l. mit dest. Wasser verdünnt.

   b) 44 ml. n/10 NaOH-Lösung werden mit der oben hergestellten Natriumcitratlösung auf 100 ml. aufgefüllt und durch tropfenweise Zugabe von 0,1 n HCL oder 0,1 n NaOH auf einen pH-Wert von 6,3 gebracht.

   c) In dieser Pufferlösung werden die 22 cm. langen und 4 cm. breiten Papierstreifen gebadet und anschließend getrocknet.
7. Laufmittelsystem: Butanol-Eisessig-Wasser (40+10+50).
8. Auftragen folgender Lösungen in einer Konzentration von 0,5 bis 0,7 ml. auf den Startpunkt des Papierstreifens:

   a) die eingedampfte Chloroformphase des Urins eines mit Marsilid vorbehandelten Patienten.

b) die eingedampfte Chloroformphase eines Leerurins (Blindversuch)

c) Auftragen von 0,05 ml. einer Lösung von 50 gamma/ml. Marsilid in Methanol.

9. Hängenlassen der Streifen einige Stunden über der Laufmittellösung zur Absättigung im Dampf der wässerigen Phase.
10. Laufzeit: ca. 12 Stunden.
11. Trocknen der Papiere.
12. Durchziehen der Streifen durch alkalische Silbernitratlösung nach Cramer (s.S.10) oder Besprühen mit derselben. Einige sec. Erhitzen der Streifen auf 70-80 Grad Celsius.
13. Baden der Streifen in 5 %-iger wässeriger Natriumthiosulfatlösung.
14. Baden der Streifen in dest. Wasser.
15. Trocknen der Streifen.

a) Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen

Nach dieser neuen Methode stellten wir 35 Chromatogramme her. Auf den Chromatogrammen der Marsilid Patienten traten deutliche scharf begrenzte Flecken mit einem Durchschnitts-Rf-Wert von 0,87 auf, und zwar ausnahmslos!

Bei den Chromatogrammen der Standardlösungen (50 gamma Marsilid/ml. Methanol) betrug der Durchschnitts-Rf-Wert 0,9, lag also um 0,02 höher, was aus größerer Breite der "Vollflecken" und dadurch verursachte Ungenauigkeiten erklärt werden kann. Die Chromatogramme der nicht mit Marsilid behandelten Personen zeigten keinerlei Flecken.

Die Personen wurden mit keinem anderen Medikament behandelt, so daß von dieser Seite keine Störungen der Versuchsergebnisse auftreten konnten.

Dagegen untersuchten wir die Urine von Rauchern sowie von Nichtrauchern, um festzustellen ob bei Rauchern auch die gleichen Flecken auftreten.

Die Chromatogramme von Rauchern, die kein Marsilid eingenommen hatten, zeigten keinerlei Marsilidflecken. Dagegen traten Flecken mit einem Rf-Wert von 0,12 bis 0,2 auf, die bei den Chromatogrammen der Nichtraucher fehlten.

Die Chromatogramme von Rauchern, die unter Marsilid standen, zeigten Flecken im Bereich Rf 0,2 und zusätzlich Flecken im Bereich Rf 0,87-0,9.

Die Flecken mit dem Ef-Wert 0,12-0,2, die bei den Nichtraucherchromatogrammen fehlten, dürften auf die Anwesenheit des Alkaloids Nikotin hinweisen.

Die folgende Tabelle stellt eine kurze Zusammenfassung der Versuchsergebnisse dar und zeigt die Durchschnitts-Rf-Werte der aufgetretenen Flecken.

	Marsilid-lösung	Vollurin (Raucher)	Leerurin (Raucher)	Vollurin (Nichtraucher)	Leerurin (Nichtraucher)
Rf:	0,9	0,87	-	0,87	-
Rf:	-	0,15	0,15	-	-

b) Schlußfolgerung:

Aus den Ergebnissen vermuten wir, daß Marsilid im Urin als Nikotinsäureabkömmling nachgewiesen werden kann, ohne es restlos beweisen zu können. Auch sind wir uns darüber im Klaren, daß es sich bei unserer Methode nicht um einen spezifischen sondern um einen unspezifischen Nachweis von Ipro-

niacid im Urin handelt, da Nikotinsäure auch als Abbauprodukt anderer Substanzen ausgeschieden wird.

Bei dem Flecken, der sich bei den Marsilid-Patienten zeigt und der bei allen anderen Patienten fehlt, kann es sich wohl kaum um einfache Nikotinsäure handeln. Wir wissen aber noch nicht sicher, worum es sich handelt, das ist weiteren Untersuchungen vorzubehalten. Es ist jedenfalls bemerkenswert, daß wir auf die Weise einen einfachen Marsilid-Nachweis haben, der auch nicht gestört wird, wenn die Patienten Raucher sind. Bei anderen Medikamenten, die sonst noch angewandt wurden, ließ sich ebenfalls keine Störung nachweisen.

Immer noch bleibt, daß unser Verfahren wahrscheinlich unspezifi~~sch~~ sehr ist. Da aber, wie erwähnt, die Flecken bei Rf 0,87 nur bei Marsilid-Patienten vorkommen, müssen wir schließen, daß es sicher eine gewisse Spezifität hat.

Literaturangaben

1. RIEBELING, C. : 2-Methyl-2n-propyl 1,3 propandioldicarbamat (Meprobamat). Experimentelle Ergebnisse, klinische Erfahrungen und eigene Versuche zum Nachweis der Ausscheidungsprodukte. Arzneimittelforschung 7, 181-185, 1957.

2. AGRANOFF, BRADLEY, AXELROD. : Determination and physiologic disposition of Meprobamate, Proc.Soc.Exp.Biol.Med 96 261-264, 1957.

3. LEUBE, H. : Klinische Erfahrungen mit einem neuen Tranquillizer, Med.Klinik, 2113, 1958.

4. DEUTSCHE HOFFMANN-LAROCHE AG. : Marsilid Exposê der wiss. Abt. 1959.

5. MORRIS B. JACOBS. : Microdetermination of Isoniacids, Journal of the American Pharmaceutical Association XLII, NO. 6 346-348, 1953

6. DEUTSCHE HOFFMANN-LAROCHE AG. : Wiss. Abt.

7. LEHNARTZ, E. : Chemische Physiologie, Springer, 1952
S - 194-195
S - 196
S - 440-441

8. KODICECK, HÜBNER : Trennung von Nikotinsäure u. Nikotinsäureamid, zitiert nach Chromatografie (Merck-AG Darmstadt), 88 u. 136.

9. A. BUYSKE, M. FLOWERS JUN., WILDER JUN., E. HOBBS : Nicotinic and glutaminic acids, nicotinamide and glutamine in cigarette tobacco smoke, Science, 1080, 1956

Herrn Prof. Dr. Riebeling danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die stete Hilfsbereitschaft bei der Ausführung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. Bürger-Prinz danke ich
für die Übernahme des Referates.

Lebenslauf !

Als Sohn des praktischen Arztes Dr.med. Heinrich Maintz und seiner Ehefrau Agnes Maintz, geb. Löcherbach, wurde ich am 7.Mai 1934 in Bialla/Ostpr. geboren.

Von 1940 bis 1944 besuchte ich die Volksschule Oldenfelde in Hamburg-Rahlstedt.

Von 1945 bis 1954 besuchte ich die wissenschaftliche Oberschule für Jungen in Hamburg Rahlstedt und bestand am 1.März 1954 die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1954 u. im Wintersemester 1954/55 studierte ich an der Universität Hamburg Medizin, setzte das Studium an der Universität Münster fort und bestand hier am 11.Mai 1957 die ärztliche Vorprüfung.

Das erste klinische Semester absolvierte ich an der Universität Münster.

Im Wintersemester 1957/58 und im Sommersemester 1958 studierte ich an der Universität Innsbruck (Österreich) und kehrte danach nach Münster zurück, wo ich am 13.Juli 1960 die ärztliche Prüfung bestand.

Vom 15.August 1960 bis zum 15.Februar 1961 war ich als Medizinalassistent an der medizinischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses Heidberg in Hamburg tätig. Seit dem 1.März 1961 arbeite ich als Medizinalassistent an der chirurgischen Abteilung desselben Krankenhauses.

Druck: Photo-Copie GmbH Hamburg 1